

## 尿素含量(脲酶法)检测试剂盒说明书

(货号：PB1178W96 微量法 96 样)

有效期：3 个月

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验 样本和试剂浪费！

### 测定意义：

尿素是人体内蛋白代谢的主要终产物，它构成了血液中 绝大部分的非蛋白氮。血中尿素氮来源于肝脏，通过肾脏随 尿液排出体外。肾脏功能衰竭、肾炎、泌尿道梗阻等可使血 液尿素氮含量升高。

### 测定原理：

尿素在脲酶的作用下水解产生氨离子和二氧化碳，氨离子在碱性介质中与酚显色剂生成蓝色的物质，该物质的生成 量与尿素含量成正比，在 640nm 波长比色测定。

### 需自备的仪器和用品：

酶标仪、水浴锅、离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵和蒸馏水（无氨水）

### 试剂的组成和配制：

试剂一：液体 60ml×1 瓶，4℃避光保存；

试剂二：液体 60ml×1 瓶，4℃保存；

试剂三：液体 300  $\mu$ l×1 瓶，-20℃保存；

试剂四：液体 5ml×1 瓶，-20℃保存；

标准品：液体 1ml×1 瓶，10mmol/L 尿素标准品溶液，-20℃保存；

### 样本制备：

液体样品：澄清的液体可直接检测；若浑浊则离心后取上清液检测。

细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 生理盐水，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 室温离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ $10^4$ ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

组织样本：取约 0.1g 组织，加入 1mL 生理盐水，进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

### 测定步骤：

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 640nm。

2、酶工作液的配置：试剂三：试剂四=1:10 的比列配置，根据样本量配置，临用新制。

3、尿素标准曲线的制备：取 10mmol/L 的尿素标准液用蒸馏水稀释成不同浓度：0.2mmol/L、0.5mmol/L、1mmol/L、2mmol/L、4mmol/L、6mmol/L、8mmol/L、10mmol/L，进行标准曲线的制备。

| 浓度        | 尿素标准液（ $\mu$ l） | 蒸馏水（ $\mu$ l） |
|-----------|-----------------|---------------|
| 0.2mmol/L | 2               | 98            |
| 0.5mmol/L | 5               | 95            |
| 1mmol/L   | 10              | 90            |

|          |    |    |
|----------|----|----|
| 2mmol/L  | 20 | 80 |
| 4mmol/L  | 40 | 60 |
| 6mmol/L  | 60 | 40 |
| 8mmol/L  | 80 | 20 |
| 10mmol/L | —— | —— |

4、加样表：在 EP 管中依次加入

| 试剂 (μL)                                                                                                                                   | 空白管 | 标准管 | 测定管 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 样本                                                                                                                                        |     |     | 20  |
| 标准品                                                                                                                                       |     | 20  |     |
| 蒸馏水                                                                                                                                       | 20  |     |     |
| 酶工作液                                                                                                                                      | 25  | 25  | 25  |
| 蒸馏水                                                                                                                                       | 115 | 115 | 115 |
| 混匀，37℃避光反应 15min                                                                                                                          |     |     |     |
| 试剂一                                                                                                                                       | 500 | 500 | 500 |
| 试剂二                                                                                                                                       | 500 | 500 | 500 |
| 混匀，37℃避光反应 20min                                                                                                                          |     |     |     |
| 取 200 μl 至 96 孔板中，于 640nm 处波长处读取吸光度，分别记为 A 测定管，A 标准管，A 空白管，计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{空白管}$ ； $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。 |     |     |     |

### 尿素含量计算：

1、标准曲线的绘制 以各标准溶液浓度为 x 轴，以其对应的吸光值 ( $\Delta A_{标准}$ ) 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程  $y=kx+b$ ，将  $\Delta A_{测定}$  带入公式中得到 x (mmol/L)。

### 2、尿素含量计算

(1) 按照样本蛋白浓度计算

$$\text{尿素含量 (mmol/mg prot)} = x \div \text{Cpr} \times 10^{-3} = x \div \text{Cpr} \times 10^{-3}$$

(2) 按照样本质量计算

$$\text{尿素含量 (mmol/g 鲜重)} = x \times V_{\text{样总}} \div W \times 10^{-3}$$

(3) 按照细胞数量计算

$$\text{尿素含量 (mmol/10}^4\text{cell)} = x \times V_{\text{样总}} \div 500 \times 10^{-3}$$

(4) 按照液体体积计算

$$\text{尿素含量 (mmol/L)} = x$$

W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL, 蛋白浓度需自行测定; V 样总: 加入的提取液体积, 1mL; 500: 细胞数量, 500 万;  $10^{-3}$ : 1mmol/L =  $10^{-3}$ mmol/ml。

注意:

- 1、颜色太深时，将样品作适当稀释，结果再乘以稀释倍数。
- 2、最好使用一次性塑料试管，防止污染。
- 3、酶工作也现用现配，用多少配多少，应用液不可久置。
- 4、加缓冲酶液后，应准确水浴 15 分钟，所以样本量较多时，应分批操作；同批操作数量控制在 15 个以内。



Perseebio  
谱析生物

专注试剂盒研发生产

本试剂盒仅供科研使用